LC Technical Report Vol.12 2011年01号

解離性物質の分析のコツ

逆相HPLCでの分析対象物質には様々なものがあります。酸性物質や塩基性物質は解離性物質であり、移動相のpHによって解離平衡が移動します。解離性物質の分析には、移動相に緩衝液を使用する方法とイオンペア試薬を使用する方法があります。適切な移動相を使わないと、良いピーク形状や保持時間の再現性が得られないので注意が必要です。

Keywords　解離性物質　pKa　緩衝液　イオンペアクロマトグラフィー　酸性物質　塩基性物質　テーリング抑制

解離性物質の基礎知識

解離性物質は、一種類の分子がイオンに分解して、元の分子の間に平衡を保ちながら共存する物質です。

酸性物質は、pKa(酸解離係数)より高いpHではイオンが多く存在し、低いpHでは分子が多く存在し、次のような官能基を持つ物質です。

芳香族水酸基(−OH)	リン酸基(−PO_3H)
カルボキシル基(−COOH)	スルホ基(−SO_3H)

塩基性物質は、酸性物質とは逆にpKaより低いpHではイオンが多く存在し、高いpHでは分子が多く存在する、次のような官能基を持つ物質です。

第一級アミン(−NH_2)	第二級アミン(−NH−)
第三級アミン(−N−)	第四級アミン(−N^+−)

「緩衝液を用いた分析」
分析対象物質の解離状態を一定に保って分析する方法で、主として弱酸性物質や弱塩基性物質を対象とする。解離を抑制するイオン制御法も含む。

「イオンペアクロマトグラフィー」
解離した分析対象物質と反対の電荷を有するイオン性物質(イオンペア試薬)を添加して、イオンペアを形成して分析する方法で、移動相のpH調整では解離を抑制できない強酸性物質や強塩基性物質を対象とする。

緩衝液を用いた分析

■ 緩衝液を用いた分析(酸性物質)

安息香酸(pKa=4.20)を例に説明します。pH4.2より低いpHで安息香酸分子として多く存在し、pH4.2より高いpHで安息香酸イオンとして多く存在します(Fig.1)。

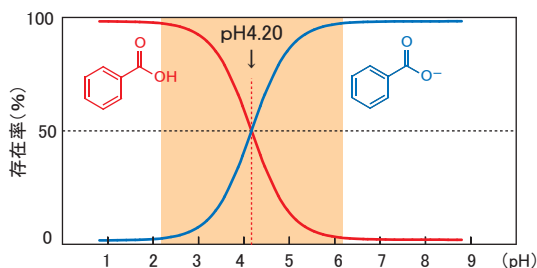



Fig.1　pHの違いによる解離・非解離状態の存在率(安息香酸)

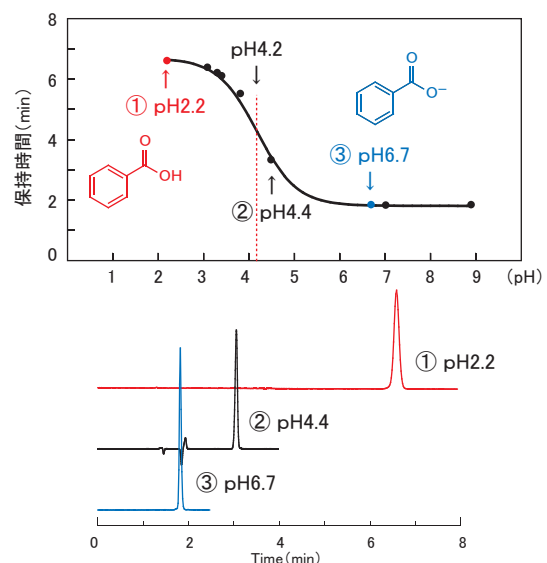
分析対象物の解離平衡の移動により、保持時間が変化します。pKaより2以上低いpHの移動相では、ほぼ非解離(安息香酸分子)となるので、保持時間は最大となります(Fig.2①)。pKaより2以上高いpHの移動相では、ほぼ解離(安息香酸イオン)しているので分析するので、保持時間は最小となります(Fig.2②)。

[Analytical conditions]
Column：*L-column ODS*(5 μm, 12 nm)4.6 × 150 mm
Mobile phase：①③CH_3CN/25 mM リン酸溶液(25/75)
②CH_3CN/25 mM 酢酸溶液(25/75)
Flow rate：1 mL/min
Sample：安息香酸

Fig. 2　移動相のpHの違いによる保持時間(安息香酸)

■ 緩衝液を用いた分析（塩基性物質）

塩基性医薬品のプロプラノロール（pKa=9.45）を例に説明します。pH9.45より低いpHでプロプラノロールイオンが多く存在し、pH9.45より高いpHでプロプラノロール分子が多く存在します（Fig.3）。

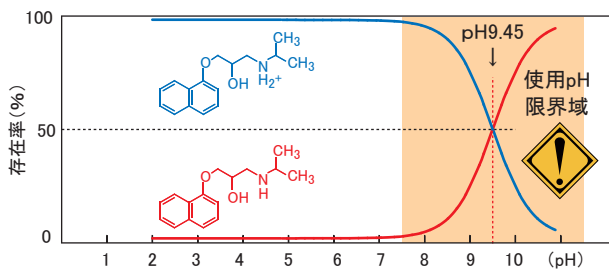



Fig.3 pHの違いによる解離・非解離状態の存在率
（プロプラノロール）

分析対象物質の解離平衡の移動により、保持時間も変化します。pKaより2以上高いpHの移動相では、ほぼ非解離となるので、保持時間は最大になりますが、シリカゲル系逆相カラムの使用可能なpHの範囲を超えてしまいます。
一般的には、酸性あるいは中性の移動相でプロプラノロールイオンを分析します。

[酸性移動相での分析]
酸性移動相ではシリカゲル表面に残存するシラノール基とプロプラノロールは以下の状態になります。

酸性移動相	
残存シラノール基	非解離
プロプラノロール	解離（プロプラノロールイオン）

このため塩基性物質は残存シラノール基との相互作用が抑制されるので、ピークのテーリングが抑えられます。（Fig.4①と②）。

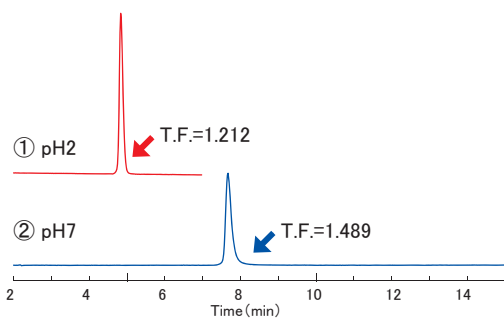



Fig.4 pHの違いによる比較（プロプラロノール）

[中性移動相での分析]
塩基性医薬品のアミトリプチリン（pKa=9.4）を例に説明します。中性移動相ではシリカゲル表面に残存するシラノール基とアミトリプチリンは以下の状態になります。

中性移動相	
残存シラノール基	解離
アミトリプチリン	解離（アミトリプチンイオン）

このため塩基性物質は残存シラノール基に吸着し、ピークがテーリングします（Fig.5②）。

[中性移動相でのテーリング抑制]
メタノールを移動相に用いると、メタノールが残存シラノールと水素結合するため、塩基性物質の吸着が抑えられます。そのためテーリングしやすい中性移動相でもシャープなピークが得られます（Fig.5①）。

中性移動相で移動相にメタノールを使用	
残存シラノール基	メタノールと水素結合
アミトリプチリン	解離（アミトリプチンイオン）

L-column2 ODS のような残存シラノール基がないカラムで分析すれば、アセトニトリルを用いた中性移動相でもシャープなピークが得られます（Fig.5③）。

中性移動相で***L-column2 ODS***を使用	
残存シラノール基	なし
アミトリプチリン	解離（アミトリプチンイオン）

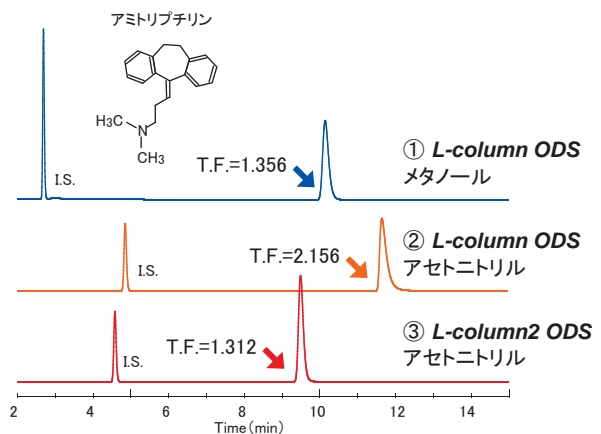



Fig.5 pHと有機溶媒の違いによる比較（アミトリプチリン）

[アルカリ性移動相での分析]
塩基性物質はアルカリ性領域で非解離となりますが、逆相HPLCに用いられるODSカラムの多くは、pH8〜9が上限になります。取扱説明書の「使用可能なpHの範囲」はあくまでも目安であり、温度や緩衝液の割合によっては、その範囲内でも劣化が促進されることもあります。中性より高いpHで使用する場合は、カラム劣化に注意してください。

■ イオンペアクロマトグラフィーによる分析（酸性物質）

スルホン酸はpKaが低く、移動相に用いるpH範囲では解離しているため保持が弱くなります。このような物質にはイオンペア試薬を用います。酸性染料（Fig.6）を例に説明します。

1. α−Naphthol Orange（Orange Ⅰ）

2. Acid Orange7（Orange Ⅱ）

3. Acid Orange5（Tropaeolin OO）

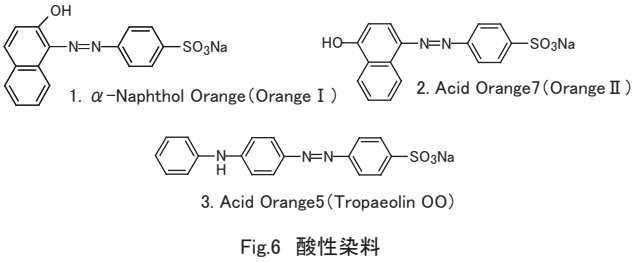
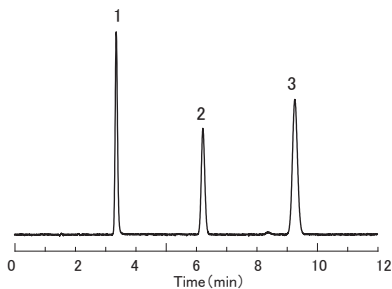
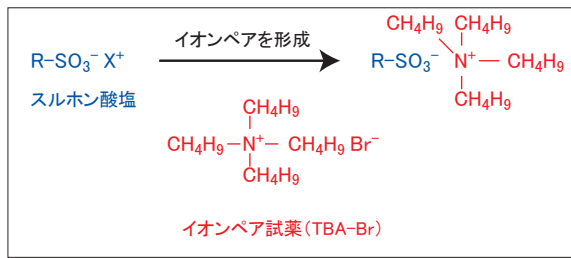
Fig.6　酸性染料

イオンペア試薬としてはテトラブチルアンモニウム（TBA）を、5～10 mMの濃度で使用するのが一般的です。移動相に添加されたTBAは、解離している分析対象物質とイオンペアを形成し、電荷を打ち消し合います。これにより疎水性が増加し保持が強くなります（Fig.7）。

［Analytical conditions］
Column：***L-column2 ODS*** 4.6×150 mm（5 μm, 12 nm）
Mobile phase：CH_3CN/H_2O（45/55）containing 10 mM TBA-PO_4
Flow rate：1 mL/min　Detection：UV 430 nm
Inj.vol：1 μL（100 mg/L in CH_3CN each）

Fig.7　イオンペアクロマトグラフィーによる分析（酸性染料）

■ イオンペアクロマトグラフィーによる分析（塩基性物質）

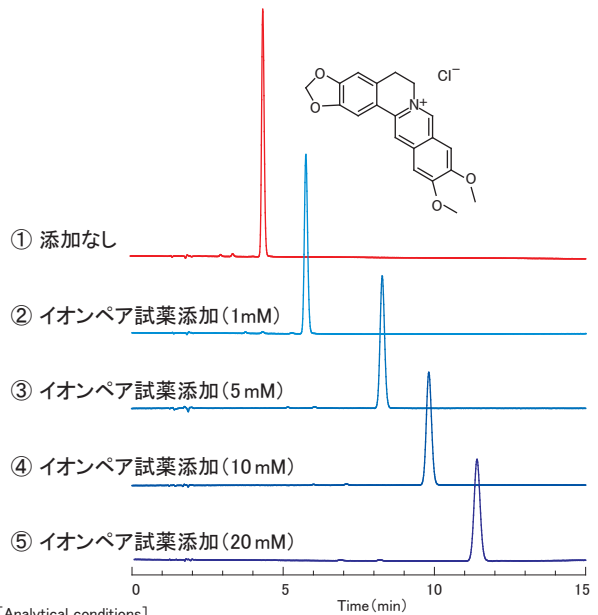
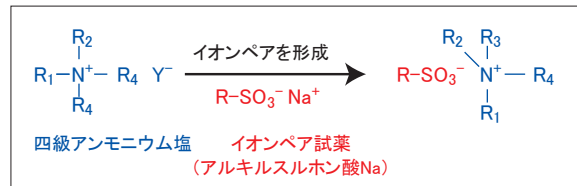
第四級アンモニウム塩のような解離している塩基性物質はイオンペア試薬を用いて分析します。イオンペア試薬を用いることにより、保持を大きくし、テーリング抑制効果があります。移動相に添加されたアルキルスルホン酸は、四級アンモニウム塩とイオンペアを形成し、電荷を打ち消し合います。これにより疎水性が増加し保持が強くなります（Fig.8①と②～⑤）。アルキルスルホン酸の添加量が増えると、保持時間は大きくなりますが（Fig.8②～⑤）、5～20 mMの濃度で使用するのが一般的です。

［Analytical conditions］
Column：***L-column2 ODS*** 4.6×150 mm（5 μm, 12 nm）
Mobile phase：①CH_3CN/20 mM $H_3PO_4$30/70）
②～⑤CH_3CN/20 mM H_3PO_4＋Sodium Hexanesulfonate（30/70）
Flow rate：1 mL/min　Inj.vol.：1 μL　Sample：Berberine chroride（50 mg/L）

Fig.8　イオンペアクロマトグラフィーによる分析（ベルベリン）

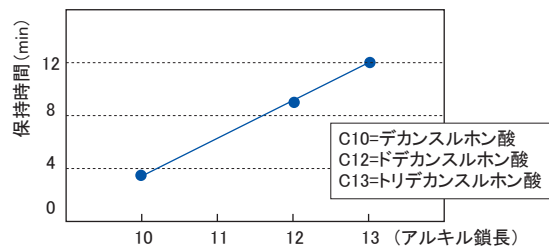
イオンペア試薬のアルキルスルホン酸は、そのアルキル鎖長に比例して分析対象物質の保持が強くなります（Fig.9）。

［Analytical conditions］
Column：***L-column ODS*** 4.6×150 mm（5 μm, 12 nm）
Mobile phase：CH_3CN/20 mM H_3PO_4＋5 mM アルキルスルホン酸（35/65）
Flow rate：1 mL/min
Sample：プロカインアミド（100 mg/L）　Inj.vol.：1 μL

Fig.9　アルキル鎖長による保持時間の変化

過塩素酸（一般的にナトリウム塩を使用）は、解離している塩基性物質とイオンペアを形成し、電荷を打ち消しあうことで保持が大きくなります（Fig.10）。有機溶媒への溶解度が高く、通常100～200 mM程度の濃度で使用します。

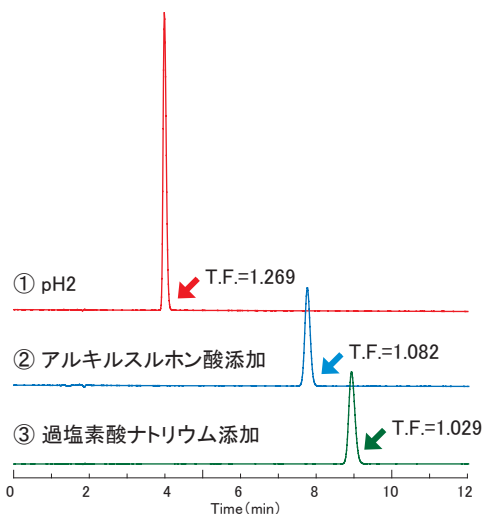
① pH2
T.F.=1.269
② アルキルスルホン酸添加
T.F.=1.082
③ 過塩素酸ナトリウム添加
T.F.=1.029
0 2 4 6 8 10 12
Time（min）

［Analytical conditions］
Column：*L-column2 ODS*（5 μm, 12 nm）4.6 × 150 mm
Mobile phase：① CH_3CN/20 mM H_3PO_4（30/70）
② CH_3CN/20 mM H_3PO_4＋5 mM Sodium Hexanesulfonate（30/70）
③ CH_3CN/20 mM H_3PO_4＋100 mM $NaClO_4$（30/70）
Flow rate：1 mL/min　Temp：40℃
Sample：Propranolol

Fig.10　イオンペア試薬の効果の違い（プロプラノロール）

イオンペア試薬を用いる分析では、カラムの平衡化に時間を要します。通常カラム容積の10倍程度移動相を流して置換しますが、イオンペア試薬を用いた場合、20～30倍移動相を流して完全に平衡化してから分析します。これは緩衝液を使う際も同じです。

■ イオンペア試薬使用上の注意

イオンペア試薬を使うと、カラム洗浄によりこれを完全に除去するのが困難ですので、イオンペア試薬専用のカラムにする方がよいでしょう。

（緩衝液使用上の注意は、Technical Report Vol.10「緩衝液について」をご覧ください）。

****

解離性物質の分析では、官能基やpKaを参考にして、緩衝液を用いた分析かイオンペアクロマトグラフィーかを決定して、さらに詳細を検討していきます（Fig.11）。

逆相HPLCの分析対象物質は様々であり、移動相に緩衝液を用いることがほとんどです。なるべく単純な移動相の方が調製の手間も省け、分析の再現性も向上します。低吸着カラムを用いればテーリング防止策は不要です。
またそのカラムの使用可能なpHが広範囲ならば、移動相のpHを決定する際に選択の幅が広がります。

上手に分析するコツとしては、低吸着性で高耐久性カラムを用いることが重要な項目です。

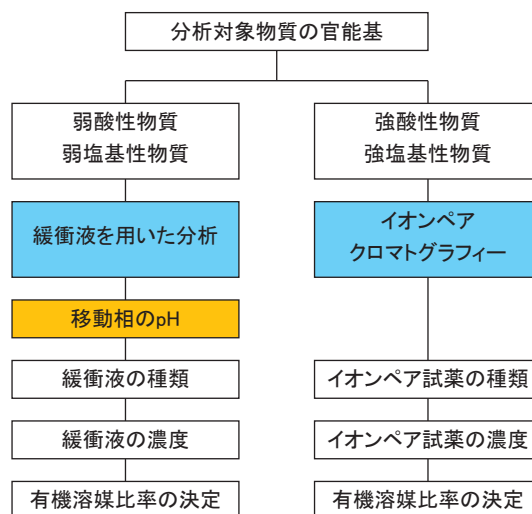



Fig.11　解離性物質の分析条件の決定（まとめ）

リーフレット内容に関してのお問い合わせは、最寄の代理店又は東京事業所クロマト技術部までご連絡ください

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
http://www.cerij.or.jp

東京事業所 クロマト技術部
e-mail chromato@ceri.jp
TEL 0480-37-2601　FAX 0480-37-2521
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地

2011/01